

AEE

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日

2001年7月5日 (05.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 01/48189 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02

392-203 Chiba (JP). 斎藤洋子 (SAITO, Youko) [JP/JP]; 〒292-0043 千葉県木更津市東太田4-5-13-103 Chiba (JP). 森川記行 (MORIKAWA, Noriyuki) [JP/JP]; 〒292-0833 千葉県木更津市貝瀬3-9-17-408 Chiba (JP). 吉田賢二 (YOSHIDA, Kenji) [JP/JP]; 〒292-0043 千葉県木更津市東太田4-11-1-302 Chiba (JP). 諫防牧子 (SUWA, Makiko) [JP/JP]; 〒144-0052 東京都大田区蒲田1-24-4 Tokyo (JP). 杉山友康 (SUGIYAMA, Tomoyasu) [JP/JP]; 〒292-0045 千葉県木更津市清見台2-6-23-102 Chiba (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/09409

(22) 国際出願日: 2000年12月28日 (28.12.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/375152

1999年12月28日 (28.12.1999) JP

特願2000/101339 2000年3月31日 (31.03.2000) JP

特願2000/155978 2000年5月23日 (23.05.2000) JP

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL GUANOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING PROTEIN-COUPLED RECEPTORS, GENES THEREOF AND PRODUCTION AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: 新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途

(57) Abstract: Fifteen novel genes sustaining hydrophobic domains, which are seemingly 7 transmembrane domains characteristic to G protein-coupled receptors, are successfully isolated by human tissue cDNA screening. These genes and proteins which are the expression products thereof are usable in screening ligands, screening agonists or antagonists which are useful as drugs, diagnosing diseases in which these gene participate, etc.

(57) 要約:

ヒト組織 cDNA のスクリーニングにより、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する 15 種類の新規遺伝子を単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングに利用し得る。

WO 01/48189 A1



LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

一 國際調査報告書

- 1 -

明細書

新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、 並びにそれらの製造および用途

技術分野

本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

G 蛋白質共役型受容体(G protein-coupled receptors)は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体群の総称である。G 蛋白質共役型受容体は、分子内に細胞膜貫通領域を 7 回有する構造上の特性から、「7 回膜貫通型受容体」とも呼ばれる。G 蛋白質共役型受容体は様々な生理活性物質の情報を、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型 GTP 結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介する cAMP、フォスフォリバーゼ C を介する Ca^{2+} などがよく知られているが、三量体型 GTP 結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた(Annu. Rev. Neurosci. (97) 20:399)。G 蛋白質共役型受容体に対する基質(リガンド)は、大変多岐に渡っており、タンパク性ホルモン、ケモカイン、ペプチド、アミン、脂質由来物質、さらにはトロンビンの様なプロテアーゼもその一例となる。現在、遺伝子が同定された G 蛋白質共役型受容体の数は感覚器受容体を除くと、ヒトで 300 個弱存在するが、リガンドが同定された G 蛋白質共役型受容体の数は、そのうち約 140 種類に過ぎず、リガンド未知な「オ

「オーファン G 蛋白質共役型受容体」が 100 種類以上存在している。しかしながら実際のヒトゲノム中には、少なくとも 400 種類、場合によっては 1000 種類もの G 蛋白質共役型受容体が存在する、とも想定されている (Trends Pharmacol. Sci. (97) 18:430)。この事は、今後のゲノム解析の飛躍的進展に伴って、機能未知なオーファン G 蛋白質共役型受容体の数も爆発的に増加する事を意味している。

これまでに世界の製薬企業により創られてきた薬剤は、その 9 割以上が細胞外空間での相互作用を標的としており、その中でも G 蛋白質共役型受容体に関連する低分子薬は大部分を占めている。その根拠としては、G 蛋白質共役型受容体が関連する疾患が、遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系など、非常に多くの領域に関連することにある。そのため、最近では多くの製薬企業がゲノム解析で明らかとなったオーファン G 蛋白質共役型受容体を所有し、リガンド探索と生理機能の解明に鋏を削っている。こうした状況を背景として、最近では新規 G 蛋白質共役型受容体の生理的リガンド探索の成功例も報告され始めている。例えば、calcitonin gene-related peptide 受容体 (J. Biol. Chem. (96) 271:11325)、orexin (Cell (98) 92:573) そして prolactin-releasing peptide (Nature (98) 393:272)などの事例は、生命科学分野での基礎研究としても大きな衝撃を持つ事例であった。

特に、オーファン G 蛋白質共役型受容体は新たな薬剤開発に繋がる可能性の高い標的として、多大な注目を集めている。一般的にオーファン G 蛋白質共役型受容体には特異的なリガンドが存在しないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーとハイスクリーピットスクリーニングと組み合わせることで、オーファン G 蛋白質共役型受容体を標的とした薬剤の創製が提唱されている (Trends Pharmacol. Sci. (97) 18:430, Br. J. Pharm. (98) 125:1387)。すなわち、遺伝子操作によって同定されたオーファン G 蛋白質共役型受容体を、細胞内セカンドメッセンジャーである cAMP, Ca^{2+} の変化を指標とした機能スクリーニングにより生理的アゴニ

ストを発見し、生体内機能解析を行うというものである。この際、化合物ライブラリーを利用して、スクリーニングをハイスループット化することにより、オーファン G 蛋白質共役型受容体に対する特異的な代替 (surrogate) アゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発も理論的には可能となる。

発明の開示

本発明は、このような G 蛋白質共役型受容体を取り巻く現状に鑑みてなされたものであり、その目的は新規な G 蛋白質共役型受容体およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することにある。さらにこれら分子を薬剤開発研究の標的として提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト組織 c DNA を鋳型にしたポリメラーゼ連鎖反応を実施することにより、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する 15 種類の新規遺伝子を単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングに利用し得る。

即ち、本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

- (1) グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記
 - (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、
 - (a) 配列番号：1 から 8、33 から 34、41 から 45 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA、
 - (b) 配列番号：9 から 16、35 から 36、46 から 50 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA、

- 4 -

(c) 配列番号：1から8、33から34、41から45のいずれかに記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、

(d) 配列番号：9から16、35から36、46から50のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAにストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA、

(2) 配列番号：1から8、33から34、41から45のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA、

(3) (1) または (2) に記載のDNAを含有するベクター、

(4) (1) または (2) に記載のDNAまたは(3) に記載のベクターを保持する形質転換体、

(5) (1) または (2) に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド、

(6) (4) に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、(5) に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (5) に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であって、

(a) (5) に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(8) (1) または (2) に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で (1) または (2) に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

- 5 -

(9) (1) または (2) に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) 細胞における変化が、cAMP 濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、(8) または (9) に記載の方法、

(11) (1) または (2) に記載の蛋白質に結合する抗体、

(12) (7) から (10) のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物、および

(13) (12) に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物、および

(14) 配列番号：9 から 16、35 から 36、46 から 50 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド、を提供するものである。

なお、本発明において「G 蛋白質共役型受容体」とは、GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体を指す。

本発明において「リガンド」とは、G 蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達する生理的物質を指す。ここで「生理的物質」とは、生体内で G 蛋白質共役型受容体に結合している化合物を指す。

本発明において「アゴニスト」とは、G 蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達しうる化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明において「アンタゴニスト」とは、リガンドがG蛋白質共役型受容体に結合すること、もしくは細胞内にシグナルを伝達することを阻害する化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明は、新規なG蛋白質共役型受容体および該蛋白質をコードするDNAを提供する。本発明に含まれる、本発明者等により単離された15のヒト由来のcDNAクローニングを、「GPRv4」、「GPRv11」、「GPRv13」、「GPRv14」、「GPRv15」、「GPRv19」、「GPRv20」、「GPRv31」、「GPRv38」、「GPRv39」、「GPRv68」、「GPRv77」、「GPRv78」、「GPRv79」、「GPRv81」と命名した（必要に応じてこれらクローニングをまとめて「GPRv」と称する）。これらcDNAの塩基配列を配列番号：9から16、35から36、46から50に、該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：1から8、33から34、41から45に示す。

BLAST検索の結果、GPRv cDNAがコードする蛋白質は、いずれも既知のG蛋白質共役型受容体と有意なアミノ酸配列上の相同性を示した。具体的には、「GPRv4」はORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して31%の相同性を、「GPRv11」はHUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P49146, 381aa)に対して31%の相同性を、「GPRv13」はPONPY C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR (P79234, 340aa)に対して39%の相同性を、「GPRv14」はCHICK P2Y PURINOCEPTOR 5 (P32250, 308aa)に対して40%の相同性を、「GPRv15」はHUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1E RECEPTOR (P28566, 365aa)に対して26%の相同性を、「GPRv19」はAPIME OPSIN, BLUE-SENSITIVE (P90680, 377aa)に対して25%の相同性を、「GPRv20」はRAT MAS PROTO-ONCOGENE (P12526, 324aa)に対して38%の相同性を、「GPRv31」はSHEEP THYROTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTOR (Q28596, 398aa)に対して29%の相同性を、「GPRv38」はP2Y PURINOCEPTOR 7 (Q15722, 352aa)に対して46%の相同性を、「GPRv39」はRAT NEUROTENSIN RECEPTOR TYPE 1 (P20789, 424aa)に対して35%の相同性を、「GPRv68」はTYPE-1B A

ANGIOTENSIN II RECEPTOR (Q13725, 359aa)に対して 39%の相同性を、「GPRv77」は HUMAN PUTATIVE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR17 (R12) (Q13304, 339aa)に対して 29%の相同性を、「GPRv78」は HUMAN GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (043603, 387aa)に対して 39%の相同性を、「GPRv79」は RAT MAS PROTO-ONCOGENE (P12526, 324aa)に対して 39%の相同性を、「GPRv81」は HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (P28222, 390aa)に対して 25%の相同性をそれぞれ示した。

また、本発明者等が単離した GPRv cDNA がコードする蛋白質（以下、「GPRv 蛋白質」と称することがある）は、いずれも G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持していた。これら事実から、GPRv cDNA は、いずれも G 蛋白質共役型受容体ファミリーに属する蛋白質をコードしていると考えられる。G 蛋白質共役型受容体は、そのリガンドの作用により G 蛋白質の活性化を通じて細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性を有しており、上記したように遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系などの非常に多くの領域の疾患に関連している。従つて、GPRv 蛋白質は、GPRv 蛋白質の機能を調節するアゴニストやアンタゴニストなどのスクリーニングに利用することができ、上記疾患に対する医薬品の開発の重要な標的となる。

本発明は、また、GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質が GPRv 蛋白質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。GPRv 蛋白質が持つ生物学的特性としては、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性が挙げられる。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、Ca²⁺を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑制する Gi 型の 3 種類のカテゴリーに分類される (Trends Pharmacol. Sci. (99) 20:118)。従つて、対象となる蛋白質が GPRv 蛋白質と同等の生物学的特性を有しているか否

かは、例えば、その活性化による細胞内の cAMP 濃度もしくはカルシウム濃度の変化を検出することにより評価することが可能である。

GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の 1 つの態様としては、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1 -8.5) が含まれる。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、GPR_v 蛋白質のアミノ酸配列 (配列番号 : 1 から 8、33 から 34、41 から 45) において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより変異した蛋白質であって、GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。これら蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、GPR_v 蛋白質の機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の 10% 以内であり、好ましくは全アミノ酸の 5% 以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の 1% 以内であると考えられる。

GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子增幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4) を利用して GPR_v 蛋白質をコードする DNA 配列 (配列番号 : 9 から 16、35 から 36、46 から 50) またはその一部をもとに同種または異種生物由来の DNA 試料から、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることは、通常行いうることである。このように GPR_v 蛋白質をコードする DNA とハイブリダイズする DNA によりコードされる蛋白質であって、GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。

このような蛋白質を単離するための生物としては、ヒト以外に、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

GPR_v 蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA を単離するためのストリンジエントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同意を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される DNA がコードする蛋白質は、通常、GPR_v 蛋白質とアミノ酸配列において高い相同意を有する。高い相同意とは、少なくとも 40%以上、好ましくは 60%以上、さらに好ましくは 80%以上（例えば、90%以上や 95%以上）の配列の相同意を指す。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLAST に基づいて BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100、wordlength = 12 とする。また、BLAST に基づいて BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合

- 1 0 -

には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.>.)。

また、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current protocols in Molecular Biology ed it. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を用いて GPRv 蛋白質をコードする DNA 配列 (配列番号 : 9 から 16、35 から 36、46 から 50) の一部を基にプライマーを設計し、GPRv 蛋白質をコードする DNA 配列と相同性の高い DNA 断片を単離し、該 DNA を基に GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることも可能である。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、リガンドに結合するがシグナル伝達を行なわないペプチドが含まれる。このようなペプチドを基に作製したアフィニティーカラムは、リガンドのスクリーニングに好適に用いることができる。また、本発明の蛋白質の部分ペプチドは、抗体作製に用いることも可能である。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。本発明の部分ペプチドは、通常、8 アミノ酸残基以上、好ましくは 12 アミノ酸残基以上 (例えば、15 アミノ酸残基以上) である。

本発明の蛋白質は、組み換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組み換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードする DNA を挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することができる。一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーショ

- 11 -

ン（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照）などにより本発明の蛋白質を調製することも可能である。

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードする DNA を提供する。本発明の DNA としては、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA なども含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。本発明の DNA は、上記のように、GPR_v 蛋白質をコードする DNA 配列（配列番号：9 から 16、35 から 36、46 から 50）あるいはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら DNA 配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター（Stratagene 社製）などが好ましい。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内で蛋白質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター（プロメガ社製）、大腸菌であれば pET ベクター（Invitrogen 社製）、培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であれば pME18S ベクター（Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)）などが好ましい。ベクターへの本発明の DNA の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11）。

また、本発明は、本発明の DNA または本発明のベクターを保持する形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。蛋白質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS 細胞、CHO 細胞などを例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

また、本発明は、本発明の蛋白質をコードする DNA (配列番号: 9 から 16、35 から 36、46 から 50 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖) に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T (ただし RNA の場合は U)、G:C の塩基対からなる 2 本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明の DNA を検出、単離するためのプローブとして、また、本発明の DNA を増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは 15 bp~35bp の鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明の DNA の少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも 15bp の鎖長のヌクレオチドが用いられる。このようなヌクレオチドは、好ましくは本発明の蛋白質をコードする DNA に特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジ

- 13 -

エントな条件下で、本発明の蛋白質をコードする DNA (配列番号：9 から 16、35 から 36、46 から 50) とハイブリダイズし、他の蛋白質をコードする DNA とはハイブリダイズしないことを意味する。

これらヌクレオチドは、本発明の蛋白質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、これらヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションや RT-PCR により、本発明の蛋白質をコードする DNA の発現異常を検査することができる。また、これらヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により本発明の蛋白質をコードする DNA やその発現制御領域を増幅し、RFLP 解析、SSCP、シーケンシング等の方法により、DNA 配列の異常を検査・診断することができる。

また、これらヌクレオチドには、本発明の蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンス DNA が含まれる。アンチセンス DNA は、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp、さらに好ましくは 500bp 以上の鎖長を有し、通常、3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内の鎖長を有する。このようなアンチセンス DNA には、本発明の蛋白質の異常 (機能異常や発現異常) などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンス DNA は、例えば、本発明の蛋白質をコードする DNA (例えば、配列番号：9 から 16、35 から 36、46 から 50) の配列情報を基にホスホロチオエート法 (Stein, 1988 *Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)*) などにより調製することが可能である。

本発明のヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどをを利用して、*ex vivo* 法や *in vivo* 法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

- 14 -

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従い本発明の蛋白質のアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成し、家兎に免疫することにより得ることが可能である (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12-11.13)。モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製した蛋白質を用いてマウスを免疫し、その脾臓細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞を調製し、該ハイブリドーマ細胞から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、本発明の蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

また、本発明の蛋白質に結合する抗体を、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。本発明の抗体は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストとして作用し得る。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウス (例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156」参照) に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクロー

ナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる(M methods in Enzymology 203, 99-121(1991))。

また、本発明は、本発明の蛋白質を利用した、本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、種々の G 蛋白質共役型受容体のリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド(例えば、ケミカルファイアルに登録されているもの)あるいはファージ・ディスプレイ法 (J.Mol.Biol. (1991) 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であつてもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、本発明の蛋白質のアフィニティーカラムに被検試料を接触させ本発明の蛋白質に結合する化合物を精製する方法、ウエストウエスタンプロッティング法など多くの公知の方法を利用することができる。これら方法を利用する場合には、被検試料は適宜標識し、この標識を利用して本発明の蛋白質との結合を検出することができる。また、これら方法の他に、本発明の蛋白質を発現する細胞膜を調製して、これをチップ上に固定し、リガンド結合時に三量体型 GTP 結合蛋白質が乖離する事を、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance) の変化で検出する方法 (Nature Biotechnology (199) 17:1105) を用いることも可能である。

- 1 6 -

また、被検試料と本発明の蛋白質との結合活性は、被検試料が細胞表面に発現させた本発明の蛋白質へ結合することにより生じる細胞における変化を指標に検出することもできる。このような変化としては、例えば、細胞内の Ca^{2+} レベルの変化や cAMP レベルの変化が挙げられるが、これらに制限されない。具体的には、G 蛋白質共役型受容体に対するアゴニスト活性は GTP γ S 結合法により測定できる。

この方法の 1 つの実施例として、G 蛋白質共役型受容体を発現させた細胞膜を 20mM HEPES (pH7.4), 100mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 50 μ M GDP 溶液中で、 ^{35}S で標識された GTP γ S 400pM と混合させ、被検試料存在下と非存在下でインキュベーション後、濾過 (filtration) を行い、結合した GTP γ S の放射活性を比較する手法を用いることができる。

また G 蛋白質共役型受容体は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達するシステムを共有している。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、 Ca^{2+} を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑制する Gi 型の 3 種類に分類される。このことを応用して Gq 蛋白 α サブユニットと他の G 蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、リガンドスクリーニングの際の陽性シグナルを Gq の細胞内伝達経路である、 Ca^{2+} 上昇に帰結させることができる。上昇した Ca^{2+} レベルは、TRE (TPA responsive element) を上流に有するレポーター遺伝子系、Fluor-3 などの染色指示薬そして蛍光蛋白 aequorin などの変化を指標として検出ができる。同様に、Gs 蛋白 α サブユニットと他の G 蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、陽性シグナルを Gs の細胞内伝達経路である、cAMP 上昇に帰結させ、CRE(cAMP-responsive element) を上流に有するレポーター遺伝子系での変化を指標とすることも可能である (Trends Pharmacol. Sci. (99) 20:118)。

このスクリーニング系において本発明の蛋白質を発現させる宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられるが、例えば、COS 細

胞、CHO 細胞、HEK293 細胞などを例示することができる。本発明の蛋白質を脊椎動物細胞で発現させるためのベクターとしては、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列や複製起点等を有するものを好適に用いることができる。例えば、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Mol. Cell. Biol. (1981) 1, 8 54-864) や、pEF-BOS (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、pCDM8 (Nature (1987) 329, 840-842)、pCEP4 (Invitrogen 社) などは、G 蛋白質共役型受容体を発現させるのに有用なベクターである。ベクターへの本発明の DNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。また、宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リボフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、FuGENE6 試薬 (ペーリンガーマンハイム社)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法により、リガンドが単離されれば、本発明の蛋白質とリガンドの相互作用を阻害する化合物のスクリーニングが可能となる。従って、本発明は、また、本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Tetrahedron (1995) 51, 8135-8137) によって得られた化合物群、あるいはファージ・ディスプレイ法 (J.Mol.Biol. (1991) 222, 301-310) などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限はない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、あるいはアフィニティカラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、リガンドを放射性同位元素などで標識して、被検試料の存在下において本発明の蛋白質と接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、本発明の蛋白質とリガンドとの結合活性を低下させる化合物を、該リガンドに付された標識を基に検出する方法を用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に、細胞内の変化を指標にスクリーニングすることも可能である。即ち、本発明の蛋白質を発現する細胞に被検試料の存在下でリガンドを接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、該細胞における変化を減少させる化合物を選択することにより、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物をスクリーニングすることが可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に調製することができる。このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの候補となる。

また、本発明は、本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存

在下で本発明の蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、
(b) 該リガンドの本発明の蛋白質への結合による細胞における変化を検出する
工程、(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で
検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を
含む。

被検試料としては、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合
物のスリーニング方法と同様に、コンビナトリアル・ケミストリー技術によって
得られた化合物群、ファージ・ディスプレイ法などを応用して作成されたランダ
ム・ペプチド群、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、生体組
織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合
成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。また、上記の本発明の蛋白
質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスリーニングにより単離された化合物
を被検試料として用いることも可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、
上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に調
製することができる。被検試料接触後の細胞における変化は、上記のスクリーニ
ング方法と同様に、細胞内の Ca^{2+} レベルや cAMP レベルの変化を指標に検出する
ことができる。また、細胞内のシグナル伝達を検出する場合には、ルシフェラ
ーゼなどをレポーター遺伝子とするレポーター・アッセイ系等の測定系を利用して検
出することも可能である。

この検出の結果、被検試料非存在下においてリガンドを接触させた場合の細胞
における変化と比較して、被検試料を接触させた場合における細胞における変化
が抑制されていれば、用いた被検試料は、本発明の蛋白質の活性を阻害する化合
物であると判定される。逆に、被検試料が該細胞における変化を増強させれば、
該化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進する化合物であると判定される。なお、
ここでいう「本発明の蛋白質の活性の促進または阻害する」とは、本発明の蛋白
質に対する直接的な作用であると、間接的な作用であるとを問わず、結果として

- 2 0 -

本発明の蛋白質の活性が促進または阻害されることを指す。従って、このスクリーニングにより単離される化合物には、本発明の蛋白質またはリガンドに作用してこれらの結合を阻害または促進することにより本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物の他、これらの結合自体を阻害または促進しないが、結果として本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物も含まれる。このような化合物には、例えば、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害しないが、細胞内のシグナル伝達経路を阻害若しくは促進する化合物が含まれる。

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、「GPRv4」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR に対し 31%の相同性を示した。

図2は、「GPRv11」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 に対し 31%の相同性を示した。

- 2 1 -

図3は、「GPRv13」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。PONPY C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTORに対し39%の相同性を示した。

図4は、「GPRv14」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。CHICK P2Y PURINOCEPTOR 5に対し40%の相同性を示した。

図5は、「GPRv15」のアミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1Eに対して26%の相同性を示した。

図6は、「GPRv19」のアミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。APIME OPSIN, BLUE-SENSITIVEに対して25%の相同性を示した。

図7は、「GPRv20」のアミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。RAT MAS PROTO-ONCOGENEに対して38%の相同性を示した。

図8は、「GPRv31」のアミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。SHEEP THYROTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTORに対して29%の相同性を示した。

図9は、「GPRv38」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。P2Y PURINOCEPTOR 7 (Q15722)に対して46%の相同性を示した。

図10は、「GPRv39」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。NEUROTENSIN RECEPTOR TYPE 1 (P20789)に対して35%の相同性を示した。

- 2 2 -

図11は、「GPRv68」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。TYPE-1B ANGIOTENSIN II RECEPTOR (Q13725)に対して、39%で最も高い相同意を示した。

図12は、「GPRv77」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。HUMAN PUTATIVE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR17 (R12) (Q13304)に対して、29%で最も高い相同意を示した。

図13は、「GPRv78」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。HUMAN GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (O43603)に対して、39%で最も高い相同意を示した。

図14は、「GPRv79」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。RAT MAS PROTO-ONCOGENE (P12526)に対して、39%で最も高い相同意を示した。

図15は、「GPRv81」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (P28222)に対して、25%で最も高い相同意を示した。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982) : "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

[実施例1] 新規G蛋白質共役型受容体をコードする遺伝子の単離

本発明の新規G蛋白質共役型受容体 (GPRv4, GPRv11, GPRv13, GPRv14, GPRv15, GPRv19, GPRv20, GPRv31, GPRv38, GPRv39, GPRv68, GPRv77, GPRv78, GPRv79, GPRv81) をコードする全長cDNAは、PCRにより取得した。

- 2 3 -

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv4 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGCCA ACTCCACAGGGCTGAACGCCT-3' (配列番号 : 17) 、リバースプライマーとして 5'-TCAGGAGAGAGAACTCTCAGGTGGCCCC-3' (配列番号 : 18) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い 5% ホルムアミド存在下で、94°C (2 分) の後、98°C (30 秒) / 65°C (30 秒) / 75°C (2 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号 : 9 に示す。

同配列は 1107 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 9 の第 1 番目から第 1107 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (368 アミノ酸) を配列番号 : 1 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv11 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCAGGC GCTTAACATTACCCGGAGC-3' (配列番号 : 19) 、リバースプライマーとして 5'-TTAATGCCCACTGTCTAAAGGAGAAC-3' (配列番号 : 20) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社) を用い 5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (2 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (2 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (2 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列は

- 2 4 -

dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：10に示す。

同配列は 1296 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：10の第1番目から第1296番目）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（431アミノ酸）を配列番号：2に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規G蛋白質共役型受容体GPRv13の増幅にはヒト胎盤由来のMarathon Ready cDNA (Clontech社) を鋳型cDNAに、フォワードプライマーとして5'-ATGGGGAA CGATTCTGTCAGCTACGAGT-3'（配列番号：21）、リバースプライマーとして5'-CTACACCTCCATCTCCGAGACCAGGTCA-3'（配列番号：22）を用いた。PCRはPyrobest DNA polymerase (宝酒造社) を用い5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5分) の後、94°C (5秒) / 72°C (2分) のサイクルを5回、94°C (5秒) / 70°C (2分) のサイクルを5回、94°C (5秒) / 68°C (2分) のサイクルを25回繰り返した。その結果、約1.1 kbpのDNA断片が増幅された。この断片をpCR2.1 plasmid (Invitrogen社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法によりABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：11に示す。

同配列は 1014 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：11の第1番目から第1014番目）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（337アミノ酸）を配列番号：3に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

- 25 -

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv14 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGTTA GCCAACAGCTCCTCAACCAACA-3' (配列番号 : 23) 、リバースプライマーとして 5'-TCAGAGGGCGGAATCCTGGGGACACTGT-3' (配列番号 : 24) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社) を用い 5% ホルムアミド存在下で 94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (2 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (2 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (2 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号 : 12 に示す。

同配列は 1119 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 12 の第 1 番目から第 1119 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (372 アミノ酸) を配列番号 : 4 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv15 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGAGT GATGAGCGGCGGCTGCCTGGCAG-3' (配列番号 : 25) 、リバースプライマーとして 5'-CTAGGACGCGGAGCCCAGCGAGTCCGAG-3' (配列番号 : 26) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い 5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、98°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.8 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配

- 2 6 -

列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：13に示す。

同配列は 1830 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：13）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（609 アミノ酸）を配列番号：5に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G蛋白質共役型受容体 GPRv19 の增幅にはヒト胎盤由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGATGGG ACTCACCGAGGGGGTGTTC-3' (配列番号：27) 、リバースプライマーとして 5'-CTAAGAGAAAATGGGTCCCTGGATCCAG-3' (配列番号：28) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94°C (2分) の後、94°C (30秒) / 55°C (30秒) / 72°C (2分) のサイクルを 30回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：14に示す。

同配列は 951 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：14）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（316 アミノ酸）を配列番号：6に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G蛋白質共役型受容体 GPRv20 の增幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGATCC AACCATCTAACCTTGGACAC-3' (配列番号：29) 、リバースプライマーとして 5'-TCAGGTTAGATAAACATCTATTGAAAGAC-3' (配列番号：30) を用いた。PCR は Pyro

- 27 -

st DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、94°C (5秒) / 72°C (4分) のサイクルを5回、94°C (5秒) / 70°C (4分) のサイクルを5回、94°C (5秒) / 68°C (4分) のサイクルを25回繰り返した。その結果、約1.1 kbpのDNA断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：15に示す。

同配列は1116塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：15）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（322アミノ酸）を配列番号：7に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規G蛋白質共役型受容体GPRv31の増幅にはヒト胎児由来のMarathon Ready cDNA (Clontech社) を鋳型cDNAに、フォワードプライマーとして5'-ATGGTTGG AGACACATTAAAACCTTCTG-3'（配列番号：31）、リバースプライマーとして5'-TC ATGGCATGACAACCAGATTAGGAAAG-3'（配列番号：32）を用いた。PCRはPyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94°C (2分) の後、94°C (30秒) / 50°C (30秒) / 72°C (2分) のサイクルを30回繰り返した。その結果、約1.1 kbpのDNA断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：16に示す。

同配列は1062塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：16）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（353アミノ酸）を配列番号：8に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型受容体の

- 2 8 -

特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv38 の増幅にはヒト脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGTCGGTCT GCTACCGTCCCCAGGGA-3' (配列番号: 37) 、リバースプライマーとして 5'-TCA AAGGTCCCATTCCGGACCGTCCTTC-3' (配列番号: 38) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、98° C (2.5 分) の後、98° C (5 秒) / 72° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 70° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Bio systems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 35 に示す。

同配列は 1077 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 35) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (358 アミノ酸) を配列番号: 33 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv39 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGTCA GGGATGGAAAAACTTCAGAATG-3' (配列番号: 39) 、リバースプライマーとして 5'-TCAGGTTTGTAAAGTGGAAAGCTTGATAG-3' (配列番号: 40) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 50° C (30 秒) / 72° C (1.5 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR 2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの

- 2 9 -

塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：3 6 に示す。

同配列は 1248 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：3 6）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（415 アミノ酸）を配列番号：3 4 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv68 の增幅にはヒトゲノム DNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCAGATGGCCGATGCAGGCCACGATA G-3' (配列番号：5 1) 、リバースプライマーとして 5'-TCAGTAGGCAGAGCTGCTGG GCAGCAGG-3' (配列番号：5 2) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、98° C (2.5 分) の後、98° C (30 秒) / 55° C (30 秒) / 72° C (4 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.4 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローニングの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：4 6 に示す。

同配列は 1410 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：4 6）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（469 アミノ酸）を配列番号：4 1 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv77 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-atgaac aacaataacaacatgtattcaac-3' (配列番号：5 3) 、リバースプライマーとして 5'

- 3 0 -

-tcaaccatatgattgcatatgtgctgaa-3' (配列番号: 5 4) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94° C (2.5 分) の後、94° C (30 秒) / 55° C (30 秒) / 72° C (3 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 4 7 に示す。

同配列は 1011 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 4 7) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (336 アミノ酸) を配列番号: 4 2 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv78 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCAC ACCGTGGCTACGTCCGGACCCA-3' (配列番号: 5 5) 、リバースプライマーとして 5'-TCAGAGAGGGCGTTGTCCCTCCCCCAGG-3' (配列番号: 5 6) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、98° C (2.5 分) の後、98° C (5 秒) / 72° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 70° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR 2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 4 8 に示す。

同配列は 1197 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 4 8) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (398 ア

- 3 1 -

ミノ酸) を配列番号: 4 3 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv79 の増幅にはヒトゲノム DNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-atggatccaaccacccggcctgggaa-3' (配列番号: 5 7) 、リバースプライマーとして 5'-ctacaccagactgcttctcgacatctcc-3' (配列番号: 5 8) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 55° C (30 秒) / 72° C (2.5 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 4 9 に示す。

同配列は 993 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 4 9) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (330 アミノ酸) を配列番号: 4 4 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv81 の増幅にはヒトゲノム DNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGGGGATGAGCTGGCACCTTGCCCTG-3' (配列番号: 5 9) 、リバースプライマーとして 5'-CTAGGAAATGGTAAAGATGGCCTGGTGC-3' (配列番号: 6 0) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 55° C (30 秒) / 72° C (2.5 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377

- 3 2 -

DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：50に示す。

同配列は 1044 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：50）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（347 アミノ酸）を配列番号：45に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

【実施例2】新規G蛋白質共役型受容体のアミノ酸配列でのSWISS-PROTに対するBLAST検索

「GPRv4」のアミノ酸配列でのSWISS-PROTに対するBLAST (Basic local alignment search tool) [S. F. Altschul et al., J.Mol.Biol., 215: 403-410 (1990)]検索結果を図1に示した。「GPRv4」は既知G蛋白質共役型受容体の中ではORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して31%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv4」が新規G蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv11」のアミノ酸配列でのSWISS-PROTに対するBLAST検索結果を図2に示した。「GPRv11」は既知G蛋白質共役型受容体の中ではHUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P49146, 381aa)に対して、31%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv11」が新規G蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv13」のアミノ酸配列でのSWISS-PROTに対するBLAST検索結果を図3に示した。「GPRv13」は既知G蛋白質共役型受容体の中ではPONPY C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR (P79234, 340aa)に対して、39%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv13」が新規G蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv14」のアミノ酸配列でのSWISS-PROTに対するBLAST検索結果を図4に示した。「GPRv14」は既知G蛋白質共役型受容体の中ではCHICK P2Y PURINOCEP

- 3 3 -

TOR 5 (P32250, 308aa)に対して、40%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv14」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv15」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 5 に示した。「GPRv15」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1E RECEPTOR (P28566, 365aa)に対して 26%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv15」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv19」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 6 に示した。「GPRv19」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では APIME OPSIN, BLUE-SENSITIVE (P90680, 377aa)に対して 25%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv19」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv20」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 7 に示した。「GPRv20」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では RAT MAS PROTO-ONCOGENE (P12526, 324aa)に対して 38%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv20」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv31」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 8 に示した。「GPRv31」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では SHEEP THYROTROPIN-RELEASED HORMONE RECEPTOR (Q28596, 398aa)に対して 29%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv31」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv38」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 9 に示した。「GPRv38」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、P2Y PURINOCEPTOR 7 (Q15722, 352aa)に対して 46%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv38」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv39」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 10 に示した。「GPRv39」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、RAT NEUROTENSIN RECEPTOR TYPE 1 (P20789, 424aa)に対して 35%で最も高

- 3 4 -

い相同性を示した。このことから「GPRv39」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv68」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 1 1 に示した。「GPRv68」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、TYPE-1B ANGIOTENSIN II RECEPTOR (Q13725, 359aa)に対して、39%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv68」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv77」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 1 2 に示した。「GPRv77」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、HUMAN PUTATIVE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR17 (R12) (Q13304, 339aa)に対して、29%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv77」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv78」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 1 3 に示した。「GPRv78」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、HUMAN GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (043603, 387aa)に対して、39%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv78」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv79」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 1 4 に示した。「GPRv79」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、RAT MAS PROTO-ONCOGENE (P12526, 324aa)に対して、39%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv79」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv81」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 1 5 に示した。「GPRv81」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (P28222, 390aa)に対して、25%で

- 3 5 -

最も高い相同意を示した。このことから「GPRv81」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

産業上の利用の可能性

本発明により、新規 G 蛋白質共役型受容体 (GPRv4, GPRv11, GPRv13, GPRv14, GPRv15, GPRv19, GPRv20, GPRv31, GPRv38, GPRv39, GPRv68, GPRv77, GPRv78, GPRv79, GPRv81) 、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該蛋白質の製造方法が提供された。さらに、該蛋白質の活性を修飾する化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明の蛋白質やその遺伝子、または本発明の蛋白質の活性を修飾する化合物は、本発明の G 蛋白質共役型受容体蛋白質が関与する疾患の新しい予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。

- 3 6 -

請求の範囲

1. グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA。

(a) 配列番号：1 から 8、33 から 34、41 から 45 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(b) 配列番号：9 から 16、35 から 36、46 から 50 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：1 から 8、33 から 34、41 から 45 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(d) 配列番号：9 から 16、35 から 36、46 から 50 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA にストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA。

2. 配列番号：1 から 8、33 から 34、41 から 45 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA。

3. 請求項 1 または 2 に記載の DNA を含有するベクター。

4. 請求項 1 または 2 に記載の DNA または請求項 3 に記載のベクターを保持する形質転換体。

5. 請求項 1 または 2 に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド。

6. 請求項 4 に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、請求項 5 に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。

7. 請求項 5 に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であつて、

(a) 請求項 5 に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

- 3 7 -

8. 請求項 1 または 2 に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で請求項 1 または 2 に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

9. 請求項 1 または 2 に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 細胞における変化が、cAMP 濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

11. 請求項 1 または 2 に記載の蛋白質に結合する抗体。

12. 請求項 7 から 10 のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物。

13. 請求項 12 に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物。

14. 配列番号：9 から 16、35 から 36、46 から 50 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド。

1 / 15

図 1

>sp|Q91178|GPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (FRAGMENT).
Length = 428

Score = 256 (90.1 bits), Expect = 4.8e-36, Sum P(2) = 4.8e-36
Identities = 72/232 (31%), Positives = 119/232 (51%)

Query: 10 SEVAGSLGLILAAVVEVGALLNGALLVVVLRPGLRDALYLAHLCVVDLLAASIMPLG 69
Sbjct: 42 SQMKDLFGLFCMVTLNLIALLANTGVMVAIRAPHLKFAFVCHLCAVDVLCAILLMPLG 101

Query: 70 LLAAPPPGLGRVRLGPAPCRAARFLSAALLPACTLGVAAALGLARYRLIVHPLRPGSRPPP 129
Sbjct: 102 IISSSP-FFGTVVFTILECQVYIFLNVFLIWLISILTIAISVERYFYIVHPMRYEVKMTI 160

Query: 130 VLVLTA---VWAAAGLLGALSLLGPPP---APPPAPARCSVLAGGL---GPFRPLWALLA 180
Sbjct: 161 NLVIGVMLLIWFKSLLALVTLFGWPPYGHQSSIAASHCSLHASHSRLRGVFAVLCVIC 220

Query: 181 FALPALLLLGAYGGIFVVARAALR--PPRP---ARGSRLRSDSLSRSLSI 227
Sbjct: 221 FLAPVVVIFSVSAYVKVARSAALQQVPAVPTWADASPAKDRSDSINSQTTII 273

Score = 174 (61.3 bits), Expect = 4.8e-36, Sum P(2) = 4.8e-36
Identities = 53/144 (36%), Positives = 70/144 (48%)

Query: 216 RSDSLSRSLI----LPP-LRPR--LPGGKAALAPALAVGQFAACWL PYGCACLAPAAR 267
Sbjct: 262 RSDSINSQTTIITTRTLPQRSPERAFASSGGKAALTAFIVGQFLVCWL PFFIFHLQMSLT 321

Query: 268 AA-----EAEAAVTWVAYSAAHPFLYGLLQRPVRLALGRLSRRALPGPVRA--CTPQA 320
Sbjct: 322 GSMKSPGDLEEAVNWLAYSSFAVNPSFYGLLNQIRDELVKFRRCCVTQPVEIGPSSLEG 381

Query: 321 WHPRALLQCLQRPPPEGPAVGPSA 344
Sbjct: 382 SFQENFLQFIQRTSSSSETHPSFA 405

Score = 49 (17.2 bits), Expect = 4.4e-12, Sum P(2) = 4.4e-12
Identities = 16/55 (29%), Positives = 21/55 (38%)

Query: 148 LLGPPPAPPPAPARCSVLAGGLGPFRPLWALLAFALPALLLGAYGGIFVVARA 202
Sbjct: 23 LFGPHPTVPPD---VGVVTSSQSQMKDLFGLFCMVTLNLIALLANTGVMVAIRARA 74

2 / 15

図 2

>sp|P49146|NY2R_HUMAN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (NPY2-R).
Length = 381

Score = 440 (154.9 bits), Expect = 3.7e-42, P = 3.7e-42
Identities = 98/309 (31%), Positives = 174/309 (56%)

Query: 38 PELPGRAKL-----ALVLTVLIFALALFGNALVFYVVTRSKAMRTVTNIFICSLALSDL 92
PEL K L+L I L + GN+LV +VV + K+MRTVTN FI +LA+DL
Sbjct: 38 PELIDSTKLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADL 97

Query: 93 LITFFCIPVTLQNIISDNWLGGAFICKMVPFVQSTAVVTEILTMTCIAVERHQGLVHPFK 152
L+ C+P, T+ + W G +C +VP+ Q AV +T+T IA++RH+ +V+ +
Sbjct: 98 LVNTLCLPFTLTYTLGEWKMGPVLCILVPAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLE 157

Query: 153 MKWQYTNRRAFTMLGVVWLVAVIVGSPMWHVQQLEIKYDFLYEKEHICCLEEWTS---V 209
K + R +F ++G+ W ++ ++ SP+ ++ + + + + E + C E+W +
Sbjct: 158 SK--ISKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSL-IEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSI 214

Query: 210 HQKIYTTFILVILFLLPLMVMILYLISKIGYELWIKKRVGDGSVLRTIHGKEMSKIARKKK 269
+ +Y+ L+IL++LPL ++ Y++I +L K V G+ H +++++
Sbjct: 215 YGTVYSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKL--KNHVSAGNDHYH-----QRRQ 264

Query: 270 RAVIMMVTVVALFAVCWAPFHVVHMMIEYSNFEKEYDDVTIKMIFAIVQIIGFSNSICNP 329
+ M+V VV +FAV W P H + ++ + + D K+IF + II ++ NP
Sbjct: 265 KTTKMLVCVVVVFAVSWLPLHAFQLAVDIDS--QVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANP 322

Query: 330 IVYAFMNNENFKKNVLSA 346
++Y +MN N++K LSA
Sbjct: 323 LLYGWMNSNYRKAFLSA 339

3 / 15

図 3

>sp|P79234|C5AR_PONPY C5A ANAPHYLATOXIN CHEMOTACTIC RECEPTOR (C5A-R)
(FRAGMENT).
Length = 340

Score = 614 (216.1 bits), Expect = 1.3e-60, P = 1.3e-60
Identities = 130/329 (39%), Positives = 187/329 (56%)

Query:	8 YEGDYSSDLSDR--PVDCLDGACLAIDPLRVAPLPLYAAIFLVGVPGNAMVAWVAGKVAR	65
	YE+ D +D+ D PVD	D + L ++A +FLGV GNA+v WV A+
Sbjct:	4 YEHYDDNDMLDANTPVDKTSNTLRVPD---ILALVIFAVVFLVGVLGNALVVVTAFEAK	60
Query:	66 RRVGATWLLHLAVADLLCCLS PILAVPIARGGHWPYGAVGCRALPSIILLTMYASVLL	125
	R + A W L+LAVAD L CL+LPIL I + HWP+G CR LPS+ILL MYAS+LLL	
Sbjct:	61 RTINAIWFLNLAVADFLSCLALPILFTSIVQHHHWPFGAACRILPSLILLNMYASILL	120
Query:	126 AALSADLCFLALGPAWWSTVQRACGVQVACGAATLALLTVPSAIYRRRLHQEHFPARLQ	185
	A +SAD L P W + A +AC AW LALLLT+PS +YR + +E+FP ++	
Sbjct:	121 ATISADRFLVFNPICQNFRGAGLAWIACAVAWGLALLTIPSFLYRVVREEFPPKVL	180
Query:	186 CVVDYGGSSSTENAVTAIRFLFGFLGPLVAVASCHSALLC--WAARRCRPLGT----AI	238
	C VD+G E AV +R + GF+ PL+ + C++ LL W+ R R T A+	
Sbjct:	181 CGVDHGHDKRRERAVAIVRLVLGFVWPLLTICYTFLRTWSRRATRSTKTLKVVAV	240
Query:	239 VVGFFVCWAPYHLLGLVLTVAPNSALLARALRAEPLIVGLALAHSCLNPMFLYFGRA-	297
	V FF+ W PY + G++++ P+S + + L + A + C+NP++++ G+	
Sbjct:	241 VASFFIFWLPYQVTGMMMSFLEPSSPTFLKKLDSCLCISFAYINCCINPIIYVAGQGF	300
Query:	298 --QLRRSLPAACHWALRESQQQDESVDSSKKST	327
	+LR+SLP+ L E ES +ST	
Sbjct:	301 QGRLRKSLPSLLRNVTEESVVRESKSFRST	332

4 / 15

図 4

>sp|P32250|P2Y5_CHICK P2Y PURINOCEPTOR 5 (P2Y5) (PURINERGIC RECEPTOR 5) (6H1).
 Length = 308

Score = 551 (194.0 bits), Expect = 6.4e-54, P = 6.4e-54
 Identities = 113/281 (40%), Positives = 172/281 (61%)

Query: 22 HRLHLVVYSLVLAAGLPLNALALWFLRALRVHSVSVYMCNLAASDLLFTSLPVRLSY 81
 + L+ V+S+V GL N +A+++F L+V + + YM NLA SDLLF +LP R+ Y
 Sbjct: 14 YTLYGCVFSMVFVLGLIANCAIYIFTFTLKVNRNETTYMLNLAISDLLFVFTLPFRIYY 73

Query: 82 YALHHWPFPDLLCQTTGAIFQMNMYGSCIFLMLINVDRYAAIVHPLRLRHLRRPRVARLL 141
 + + +WPF D+LC+ + +F NMYGS +FL I+VDR+ AIVHP R+ LR R AR++
 Sbjct: 74 FVVRNWPFGDVLCKISVTLFYTNMYGSILFLTCISVDRFLAIVHPFRSKTLRTKRNARIV 133

Query: 142 CLGWALILVFAVPAARVHRPSRCRYRROLEVRLCFESFSDELWKGRLLPLVLLAEALGFL 201
 C+ VW +L + PA+ S R + E R CFE+F + WK L +V+ E +GF
 Sbjct: 134 CVAVWITVLAGSTPASFFQ--STNRQNNTEQRTCFENFPESTWKTYLSRIVIFIEIVGFF 191

Query: 202 LPLAAVYSSGRVFWTLARPATQSQR--RRKTVRLLLNLVIFLLCFVPYNSTLAVYGL 259
 +PL V S V TL +P + +K +++ +LVIF CFVPYN TL +Y L
 Sbjct: 192 IPLILNVTCSMTMVLRTLNKPLTLSRNKLSKKVVKMIFVHLVIFCFCFVPYNITLILYSL 251

Query: 260 LRSKL-VAASVPARDRVRGVLMVVLAGANCVLDPLVYYFSAE 302
 +R++ + SV VR + V + +A +NC DP+VYYF+++

Sbjct: 252 MRTQTWINCSVVTA--VRTMYPVTLCAVSNCDFDPIVYYFTSD 293

5 / 15

図 5

>sp:5H1E_HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1E RECEPTOR (5-HT-1E) (SEROTONIN RECEPTOR) (5- HT1E) (S31).
Length = 365

Score = 58.6 bits (139), Expect = 3e-08
Identities = 35/132 (26%), Positives = 66/132 (49%), Gaps = 8/132 (6%)

Query: 20 LSLLANAWGILSVGAKQKKWKPLEFLLCTLAATHMLNVAVPIATYSVVQLRRQRPDFEWN 79
L+ L N I+++G +K +P +L+C+LA T +L VAV + S++ + R W
Sbjct: 35 LTTLLNLAVIMAIGTTKKLHQ PANYLICSLAVTDLL-VAVLVMPHSIIYIVMDR---WK 89

Query: 80 EG--LCKVFVSTFYTLTLATCFSVTSLSYHRMWMVCWPVNRYRLSNAKKQAVHTVMGIWMV 137
G LC+V++S T + + + + R W + + Y K+A ++ +W +
Sbjct: 90 LGYFLCEVWLSVDMTCCTCSILHLCVIALDRYWAITNAIEYARKRTAKRAALMILTVWTI 149

Query: 138 SFILSALPAVGW 149
S +S +P + W
Sbjct: 150 SIFIS-MPPLFW 160

6 / 15

6

7 / 15

図 7

>sp:MAS RAT MAS PROTO-ONCOGENE.

Length = 324

Score = 184 bits (463), Expect = 2e-46

Identities = 108/283 (38%), Positives = 168/283 (59%), Gaps = 21/283 (7%)

Query: 37 VSLVGLTGNAVVLWLLGCRMRNNAFSIYIYLAAADFLFLSGRLI----YSLLSFISIPH 92
+S +G N ++LW L RMRN F++YI +L+ AD L I Y+L +S H

Sbjct: 41 ISPLGFVENGILLWFLCFLMRNPFTVYITHLSIADISLLFCIFILSIDYALDYELSSGH 100

Query: 93 TISKILYPV-MMFSYFAGLSFLSAVSTERCLSVLWPIWYRCHRPTHLSAVVCVLLWALSL 151
+ + V +F Y GL L+A+S ERCLSVL+PIWYRCHRPH SA VC LLWALS

Sbjct: 101 YYTIVTLSVTFLFGYNTGLYLLTAISVERCLSVLYPIWYRCHRPHQS AFVCALLWALSC 160

Query: 152 LRSILEWMLCGFLFSGADSANCQTS-----FITVAWLIFLCVVLCGSSLVLLIRILCG 205
L + +E+++C + SG +S SD FI + + + + + SS +L+++I

Sbjct: 161 LVTTMEYVMC--IDSGEESH--SQSDCRAVIIFIAILSFLVFTPLMLVSSTILVVKIRKN 216

Query: 206 SRKIPLTRLYVTILLTVLVFLLCGLPFGIQFFLFLWIHVDRVLFCVHLVSIFLSALNS 265
+ + +LY+ I++T+++FL+ +P + +L+ + F +H +S+ S +NS

Sbjct: 217 TWASHSSKLYIVIMVTIIIIFLIFAMPMRVLYLLY---YEYWSTFGNLHNISLLFSTINS 272

Query: 266 SANPIIYFFVGSFRQRQNRQNLKLVLRQALQDASEV--DEGGG 306

SANP IYFFVGS +++++ R++LK+VL RA +D + EG G

Sbjct: 273 SANPFIYFFVGSSKKRFRESLKVVLRAFKDEMOPRQRQEGNG 315

8 / 15

図 8

>sp:TRFR_SHEEP THYROTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTOR (TRH-R)
(THYROLIBERIN RECEPTOR).
Length = 398

Score = 41.4 bits (95), Expect = 0.003

Identities = 26/87 (29%), Positives = 43/87 (48%), Gaps = 3/87 (3%)

Query: 53 LIQTGVGILGNSFLLCFYNLILFTGHKLRTDLILSQLALANSVLFFKGIPQTMAAFL 112
LI G+GI+GN ++ +++ T H PT+ L LA+A+ MVL G+P +

Sbjct: 33 LIICGLGIVGNIMVVL---VVMRTKHMRTPTNCYLVS LAVADLMVLVAAGLPNITDSIYG 89

Query: 113 KYLLNDTGCKFVFYYHRVGTRVSLSTI 139
++ GC + Y +G -S +I

Sbjct: 90 SWVYGYVGCLCITYLQYLGINASSCSI 116

9 / 15

図 9

>sp|Q15722|P2Y7_HUMAN P2Y PURINOCEPTOR 7 (P2Y7) (LEUKOTRIENE B4 RECEPTOR)
(CHEMOATTRACTANT RECEPTOR-LIKE 1).

Length = 352

Score = 606 (213.3 bits), Expect = 9.7e-60, P = 9.7e-60
Identities = 147/316 (46%), Positives = 188/316 (59%)

Query: 25 AFLLLAALL--GLPGNGFVVWSLAGWRPARGRPLAATLVLHLALADGAVLLLTPLFVAFL 82
A +LL+ L GLPGN FVVWS+ + + R + A +VL+LALAD AVLL P F+ FL
Sbjct: 21 AIILLSVALAVGLPGNSFVVWSIL--KRMQKRSVTALMVLNLALADLAVLLTAPFFLHFL 78

Query: 83 TRQAWPLGQAGCKAVYYCALS MYASVLLTGLLSLQRCLAVTRPFLAPRLRSPALARLL 142
+ W G AGC+ +YVC +SMYASVLL +SL R LAV RPF++ +LR+ A+ARR+L
Sbjct: 79 AQGTWSFGLAGCRLCHYVCGVSMYASVLLITAMS LDRSLAVARPFVSQKLRTKAMARRVL 138

Query: 143 LAVWLAALLLAVPAAVYRHL--WRDRVCQLC---HPSPVHAAHLSLETLTAFVLPFGLM 197
+W+ + LLA P YR + W+ + LC +PS H A HL E +T F+LPF +
Sbjct: 139 AGIWVLSFLLATPVLAYRTVVPWKTNM-SLCFPYPSEGHRFLIFEAVTGFLLPFLAV 197

Query: 198 LGCYSVTLARLRGARWGSGRH GARVGR L VSAIVLAFGLLWAPYHAVNLLQAVAALAPPEG 257
+ YS RL+ R+ R R GRLV I+L F W PYH VNL +A ALA
Sbjct: 198 VASYSIDGRRLQARRF---RRSRRTGRLVLIILTFAFWLPYHVNLAEGRALAGQAA 254

Query: 258 ALAKLGGAGQAARAGTTALAFFSSSVNPVLYVFTAGDLLPRA GPRFLTRLFEGSG-EA-- 314
L +G AR ALAF SSSVNPVLY G LL AG F+ +L EG+G EA
Sbjct: 255 GLGLVGKRLSLARNVLIALAFLSSSVNPVLYACAGGGLLRSAGVGVAKLLEGTGSEASS 314

Query: 315 --RGG--GRS-REGTMELRTTP 331
RGG G++ R G L P
Sbjct: 315 TRRGGSLGQTARSGPAALEP GPG 336

10 / 15

図 10

>sp|P20789|NTR1_RAT NEUROTENSIN RECEPTOR TYPE 1 (NT-R-1) (HIGH-AFFINITY LEVOCABASTINE- INSENSITIVE NEUROTENSIN RECEPTOR) (NTRH).
Length = 424

Score = 340 (119.7 bits), Expect = 3.4e-48, Sum P(2) = 3.4e-48
Identities = 74/209 (35%), Positives = 126/209 (60%)

Query: 48 VSVVYVP IFVVGVIGNVLVCLVILQH--QAMKTPNYYLFS LAVSDLLVLLGMP LEVY 104
Sbjct: 67 VTAIYLALFVVGTVGNSVTAFTLARKKSLQSLQSTVHYHLGSLA LSDL LILLIAMP VELY 126

Query: 105 E-MWRNYPFLFGPGVGCYFKTALFETVCFA S ILSITTVS V E RY VAI LHPFRAKLQSTR RRA 163
Sbjct: 127 NFIWVHHPWAFG DAGCRG YYFLR DACT YAT ALN VAS L S V E RY LA ICHPFKA KTLM SRS RT 186

Query: 164 LRILGIVWGFSVLFSLPNTSIHGIKFHYFPNGSLVPGSATCTV I KPMWIYNFIIQVTSFL 223
Sbjct: 187 KKFISAIWLASALLAIPMLFTMGLQ-NRSGDGTH-PGGLVCTPIVDTATVKVVIQVNTFM 244

Query: 224 FYLLPMTVISVLYYLMA RLKKDKSLEA D E G 254
Sbjct: 245 SFLFPMLVISILNTVIANKLTVMVHQAAEQG 275

Score = 174 (61.3 bits), Expect = 3.4e-48, Sum P(2) = 3.4e-48
Identities = 28/83 (33%), Positives = 52/83 (62%)

Query: 269 MLFVLVLVFAICWAPFHIDRLFFSFV--E EWS E SLAAV FNLV H VVSGVFFYLSSAVNPII 326
Sbjct: 309 VLRAV VIAF VV CWLPYH VRR LMFCYISD EQWTTFLDFYHYFYMLTNALFVSSAINPIL 368

Query: 327 YNLLSRRFQAAFQNVIISSFHKQW 349
Sbjct: 369 YNLVSANFRQVFLSTLACLC PGW 391

11/15

図 11

>sp|Q13725|AG2S_HUMAN TYPE-1B ANGIOTENSIN II RECEPTOR (AT1B) (AT1BR).
Length = 359

Score = 270 (95.0 bits), Expect = 4.5e-40, Sum P(2) = 4.5e-40
Identities = 61/153 (39%), Positives = 91/153 (59%)

Query: 82 ILISVYVVCALGLAGNLLVLYLMKSMQGWRKSSINLFVTNLALTDFQFVLTLPFWAVE 141
++I +Y ++ +G+ GN LV+ ++ K+ ++F+ NLAL D F+LTLP WAV
Sbjct: 29 VMIPTLYSIIIFVVGIFGNLSVVIVIYFYMKL-KTVASVFLNLALADLCFLLTPLWAVY 87

Query: 142 NALDFKWPFGKAMCKIVSMVTSMNMYASVFFLTAMSVTRYHSVASALKSHRTRGHGRGDC 201
A+++WPFG +CKI S S N+YASF LT +S+ RY ++ +KS R R
Sbjct: 88 TAMEYRWPFGNYLCKIASASVFSNLYASVFLLTCLSIDRYLAIYHPMKS-RLR----- 139

Query: 202 CGRSLGDSCCFSAKALCVWIWALAALASLPSAI 234
R++ AK C+ IW LA LASLP+ I
Sbjct: 140 --RTM-----LVAKVTCIIIWLLAGLASLPAII 165

Score = 176 (62.0 bits), Expect = 4.5e-40, Sum P(2) = 4.5e-40
Identities = 60/223 (26%), Positives = 101/223 (45%)

Query: 214 AKALCVWIWALAALASLPSAIFSTTVKVMGEELCLVRFPDKLLGRDRQFWLGLYHSQKVL 273
AK C+ IW LA LASLP+ I + + F + LGL K+
Sbjct: 145 AKVTCIIIWLLAGLASLPAIIHRNVFFIENTNITVCAFYESRNSTLPIGLGL---TKNI 201

Query: 274 LGFVLPLGIIICYLLLVRFIADRRAAGTKGGAAVAGGRPTGASARRLSKVTSVTIVVL 333
LG P II+ Y L+ + + K + P R + + + +VL
Sbjct: 202 LGSCFPFLIILTSYTLIWKAL-----KKAYEIQKNNP-----RNDDIFRIIMAIVL 247

Query: 334 SFFLCWLPNQALTWSILIKFNAVPFSQEYFLCQVYAFPVSVCLAHSNSCLNPVLYCLVR 393
FF W+P+Q T +LI+ + + + A P+++ +A+ N+CLNP+ Y +
Sbjct: 248 FFFF SWIPHQIFTFLDVL LIQQGIIRDCRIADIVDT-AMPITIWIAYFNNCLNPLFYGFLG 306

Query: 394 REFRKALKSLLWRIA---SPSITSMRPFTATTKP-EHEDQGLQAPAP 436
++F+K + LL I S S S + T + P ++ + PAP
Sbjct: 307 KKFKKDILQLLKYIPPKAKSHSNLSTMSTLSYRPSDNVSSSTKKPAP 354

12 / 15

図 12

>sp|Q13304|GPRH_HUMAN PUTATIVE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR GPR17 (R12).
Length = 339

Score = 175 (61.6 bits), Expect = 2.6e-24, Sum P(2) = 2.6e-24
Identities = 52/179 (29%), Positives = 86/179 (48%)

Query: 145 KFRQPNFARKLCIYIWGVVLGIIIPVTVYYSVIEATEGEESL-CYNRQMELGAMISQIAG 203
K R+P +A C ++W VV + P+ V ++ L Y + A++S
Sbjct: 141 KLRRPLYAHLCACFLWVVVAVAMAPLLVSPQTVQTNHTVCLQLYREKASHHALVS--- 196

Query: 204 LIGTTFIGFSFLVVLTSYYSFVSHLRK-IRTCTSIMEKDLTYSSVKRHLLVIQILLIVCF 262
+ F F F+ +T Y + LR+ +R +EK L +V+ +V+ I L VCF
Sbjct: 197 -LAVAFT-FPFITTVCYLLIIRSLRQGLR----VEKRLKTKAVRMIAIVLAIFL-VCF 248

Query: 263 LPYSIFKPIFYVLHQRDN---CQQLNYLIETKNILTCLASARSSTDPIIFLLLDKTFKKT 319
+PY + + + YVLH R + C L I +CL S + DPI++ + + F+
Sbjct: 249 VPYHVNRSV-YVLHYRSHGASCATQRILALANRITSCLTSNGALDPIMYFFVAEKFRHA 307

Query: 320 LYNL 323
L NL
Sbjct: 308 LCNL 311

Score = 158 (55.6 bits), Expect = 2.6e-24, Sum P(2) = 2.6e-24
Identities = 38/140 (27%), Positives = 66/140 (47%)

Query: 7 CIQPSMISSMALPIIYILLCIVGVFGNTLSQWIFLT KIGKKTSTHIYLSHLVTANLLVCS 66
C Q + + +M Y+L I+ + GNTL+ W+F+ T + + +L HL A+L
Sbjct: 23 CGQETPLENMLFASFYLLDFILALVGNTLALWLFIRDHKSGTPANVFLMHLAVADLSCVL 82

Query: 67 AMPFMSIYFLKGFQWEYQSAQCRVVFNLGTLMSMHSAMFVSSLILSWIAISRYATLMQKDS 126
+P +Y G W + CR+ FL L+M+AS++ L+ I+ R+ ++
Sbjct: 83 VLPTRLVYHFSGNHWPFGEIACRLTGFLFYLNMYASIY---FLTCISADRFLAIVHPVK 138

Query: 127 SQETTSCYEKIFYGHLLKKF 146
S + + Y HL F
Sbjct: 139 SLKL---RRPLYAHLCACF 154

13 / 15

図 13

>sp|043603|GALS_HUMAN GALANIN RECEPTOR TYPE 2 (GAL2-R) (GALR2).
Length = 387

Score = 529 (186.2 bits), Expect = 1.4e-51, P = 1.4e-51
Identities = 126/321 (39%), Positives = 175/321 (54%)

Query: 18 NASGCPGCGANASDGPVPSRAVDALVPLFFAALMLLGLVGNSLVIYVICRHKPMRTVT 77
N SGCPG G NAS +A +VPL FA + L+G VGN+LV+ V+ R + T
Sbjct: 2 NVSGCPGAG-NASQAGGGGGWHPPEAVIVPLLFA LIFLVGTVGNTLVLAVLLRGGQAVSTT 60

Query: 78 NFYIANLAATDVTFLCCVPFTALLYPLPGWVLGDFMCKFVN YIQQVSVQATCATLTAMS 137
N +I NL D+ F+LCCVPF A +Y L GWV G +CK V+++ +++ A+ TL A+S
Sbjct: 61 NLFI LN LGVADLCFILCCVPFQATIYTLGWVFGSLLCKAVHFLIFLTMHASSFTLA AVS 120

Query: 138 VDRWYVTVFPLRALHRRTPRLA VLSI WGSAAV SAPVL ALHRLSP-GPRAYCSEAFP 196
+DR+ +PL + RTPR ALA IW S S P L+ +R S C A+
Sbjct: 121 LD RYLAIRYPLHSREL RTPRN ALAAIGL IWGLSLLFSGPYLSYYRQSQLANL TVCHPAW- 179

Query: 197 SRALERAFA LYNNLLALYLLPLLATCAC YAA MRLH LGRVAVRPAPAD SALQGQVLAERAGA 256
S RA + + YLLP+L YA LR+L R AV P A S A RA
Sbjct: 180 SAPRRR RAMDI CTFVFSYLLPVVLGLTYARTLRYLWR- AVDPVAA GSG----ARRA-- 230

Query: 257 VRAKVSRLVA AVVLLFAACWGP IQLFLV LQALGPAGS WHPRSYAAYALKTWAH CMSYSNS 316
+ KV+R++ V LF CW P ++ G P + A YAL+ +H +SY+NS
Sbjct: 231 -KRKVTRMILIVAALFC LCLCWM PHHALILCVWFGQ----FPLTRATYALRILSHLV SYANS 285

Query: 317 ALNPLLYAFLGSHFRQA FRRVC 338
+NP++YA + HFR+ FR +C
Sbjct: 286 CVNPIVYALVSKHFRKG FRTIC 307

14 / 15

図 14

>sp|P12526|MAS_RAT MAS PROTO-ONCOGENE.

Length = 324

Score = 463 (163.0 bits), Expect = 1.4e-44, P = 1.4e-44
Identities = 111/284 (39%), Positives = 176/284 (61%)

Query:	32	IPV--FLILFIALVGLVGNGFVLWLLGFRMRRNAFSVYVLSLAGADF-LFLCFQIINCLV	88
	IP+	++I+ I+ +G V NG +LW L	FRMRRN F+VY+ L+ AD L C I++ +
Sbjct:	31	IPIVHWVIMSISPLGFVENGILLWFLCFRMRRNPFTVYITHLSIADISLLFCIFILS-ID	89
Query:	89	YLSNFFCSISINFPSFTTVMTC--AYLAGLSMLSTVSTERCLSVLWPIWYRCRRPRHLS	146
	Y	++ S S ++ + T +T	Y GL +L+ +S ERCLSVL+PIWYRC RP+H S
Sbjct:	90	YALDYELS-SGHYYTIVTLSVTFLFGYNTGLYLLTAISVERCLSVLYPIWYRCHRPHQS	148
Query:	147	AVVCVLLWALSLLSILEGKFCGFLFSDGDS-GWCQTFDFITA--AWLIFLFMVLCGSSL	203
	A	VC LLWALS L++ +E C + S C+ A	++L+F ++L S++
Sbjct:	149	AFVCALLWALSCLVTTMEYVMCIDSGEESHSQSDCRAVIIIFIAILSFLVFTPLMLVSSTI	208
Query:	204	ALLVRILCGSRGLPLTRLYLTILLTVLFLLCGLPFGIQWFLILWIWKDSDVLFCHIHPV	263
	L+V+I	+	++LY+ I++T+++FL+ +P + +L W F ++H +
Sbjct:	209	-LVVKIRKNTWASHSSKLYIVIMVTIIIFLIFAMPMRVLYLLYYEYWST---FGNLHNI	263
Query:	264	SVVLSSLNNSANPIIYFFVGGSFRKQWRLQQPILKLALQRALQDIAEVDHSEG	315
	S++ S++NSSANP	IYFFVGS +K+ R ++ LK+ L RA +D +	EG
Sbjct:	264	SLLFSTINSSANPFIYFFVGSSKKK-RFRES-LKVVLTAFKDEMOPRRQEG	313

15 / 15

図 15

>sp|P28222|5H1B_HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR (5-HT-1B) (SEROTONIN RECEPTOR) (5-HT-1D-BETA) (S12).

Length = 390

Score = 190 (66.9 bits), Expect = 4.1e-13, P = 4.1e-13
Identities = 74/288 (25%), Positives = 132/288 (45%)

Query: 7 PCPVGTTAWPALIQLISKTPCMPQAASN TSLGLGDLRVPSSMLYWLF LPSSLAAATLAV 66
P P G+ W L S P +A + + +P +L + L +L+ AT
Sbjct: 11 PPPAGSETWVPQANL-SSAPSQNCSAKDY-IYQDSISLPWKVLLVMLL--ALITLATTLS 66

Query: 67 SPLLLVTILRNQRLRQEPhyllPANILLSDAYILLHMLISS--SSLGGWEGRMACGIL 124
+ ++ T+ R ++L +YL+ A++ ++DL +L M IS+ + G W LG++ C
Sbjct: 67 NAFVIATVYRTRKLHTPANYLI-ASLA VT DLLVSILVMPISTMYTVTGRWTLGQVVCFW 125

Query: 125 TDAVFAACTSTILSFTAI VLHTYLAVI HPLRYLSFMSHGA AAWKAVALIWL--VACCFPTF 182
+ CT++IL I L Y A+ + Y + + A +AL+W+ ++ P F
Sbjct: 126 LSSDITCCTASILHLCVIALDRYWAITDAVEYSAKRTPKRAAVMIALVWVFSISI LPPF 185

Query: 183 LIWLSKWQDAQLEEQGASYILPPSMGTQPGCGLLVIVTYTSILCVLFLCTALIANCFWRI 242
W+ A+ EE+ + ++ T + + +T S+ + T L+ + RI
Sbjct: 186 F----WRQAKAEEEVSECVV----NTDH----ILYTVYSTVGAFYFPTLLLIALYGR 231

Query: 243 YAEAKTSGIWGQQGYSRARGTLLIHSVLITLYVSTGVVFSLDMLTRYHHIDS 294
Y EA+ S I Q +R G L + LIT S G S+ + +R + S
Sbjct: 232 YVEAR-SRILKQTPNRT-GKRLTRAQLIT--DSPGSTSSVTSINSRVPDVP 279

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09409

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K31/711, A61K48/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/00-15/09, C07K14/705

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 00/31258, A (ARENA PHARM INC), 02 June, 2000 (02.06.00). (Family: none)	1-14
A	WO, 99/61463, A1 (MILLENNIUM BIOTHERAPEUTICS INC), 02 December, 1999 (02.12.99) & US, 6115964, A	1-14
A	EP, 711831, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD), 15 May, 1996 (15.05.96) & CA, 2162799, A & JP, 8-193099, A	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 March, 2001 (27.03.01)

Date of mailing of the international search report
10 April, 2001 (10.04.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09409

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 14 are divided into groups of 15 individual inventions, i.e., inventions relating to DNAs encoding the amino acids of SEQ ID NOS:1 to 8, 33, 34 and 41 to 45 and DNAs having the sequences of SEQ ID NOS:9 to 16, 35, 36 and 46 to 50. These groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1 to 14 (inventions relating to the DNA encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and the DNA having the sequence of SEQ ID NO:9)

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K31/711, A61K48/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/00~15/09, C07K14/705

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 00/31258, A (ARENA PHARM INC) 02. 6月. 20 00 (02. 06. 00) (ファミリーなし)	1-14
A	WO, 99/61463, A1 (MILLENNIUM BIOTHERAPEUTICS INC) 02. 12月. 1999 (02. 12. 99) &US, 611 5964, A	1-14
A	EP, 711831, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD) 15. 5 月. 1996 (15. 05. 96) &CA, 2162799, A& JP, 8-193099, A	1-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 03. 01

国際調査報告の発送日

1 04.01

国際調査機関の名称及び先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N 8114

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第一欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第二欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-14に記載された発明は、配列番号1-8, 33, 34, 41-45のアミノ酸配列をコードするDNA、または配列番号9-16, 35, 36, 46-50の配列を有するDNAに係る発明群という、個々の15の発明に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは、認められない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-14 (配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA、及び配列番号9の配列を有するDNAに係る部分の発明)

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。